

ミニ特集：養液栽培における高温性水媒伝染病害の安全性診断

養液栽培におけるベイト法およびメンブレン法による 高温性 *Pythium* 属菌の検出手法

岐阜県農業技術センター わた 渡 なべ 辺 ひで 秀 き 樹

はじめに

野菜・花き類の養液栽培や鉢物類の底面給水栽培では、*Pythium* 属菌による被害がしばしば問題となる。特に、近年は夏期の異常高温が半ば常態化しつつあり、高温性の *Pythium* 属菌 (*P. aphanidermatum*, *P. myriotylum*, *P. helicoides*) による被害が目立つようになってきた。*Pythium* 病害は、発生してからでは手遅れになることが多いため、施設への侵入を可能な限り阻止し、侵入した場合でも早期に発見することが重要である。また、被害が生じた場合、同じ被害を繰り返さないため、病原菌の伝染経路を明らかにする必要がある。そのためには、精度の高い病原菌の検出手法が必要で、迅速かつ簡便であることが求められる。

本稿では、養液栽培や底面給水栽培における高温性 *Pythium* 属菌の検出方法を紹介する。なお、本研究は農林水産・食品産業科学技術推進事業の助成により行ったものである。

I ベイト法

1 ベイト法とは

Pythium 属菌は、国内では 40 種以上の存在が知られており、多くの種が水中で遊走子を豊富に形成する。遊走子は種子の発芽直後や、根が伸長する際に分泌される糖分やアミノ酸等を認識し、その方向に向かって泳いでいく性質（走化性）がある。このため、水中に放出された遊走子は、発芽直後の種子や植物の根の先端部に感染することが多く、発芽不良や苗立枯れを引き起こす。ベイト法は、この走化性を利用した検出方法で、植物の種子、葉、果実等の餌（ベイト）を土壌や水に一定期間設置して *Pythium* 属菌や *Phytophthora* 属菌を捕捉する (HENDRIX and CAMPBELL, 1970; WATANABE, 1981; 1984; THINGGAARD and ANDERSEN, 1995; SANCHEZ et al., 2000)。筆

者らの研究では、高温性の *Pythium* 属菌を対象に 8 種類の捕捉用素材を供試して試験を行った結果、ベントグラス葉やアサ種子およびエゴマ種子の捕捉性が優れていた (WATANABE et al., 2008)。

2 ベイト法の特徴

ベイト法は、原水や培養液、土壌や栽培資材からの直接検出に適しており、特別な機材を必要としないため非常に簡便である。ベイトを現地の水や培養液に 3 日程度設置した後に回収して、*Pythium* 属菌が捕捉されているかどうかを、選択培地を用いて確認する。高温性の *Pythium* 属菌を対象とする場合は、回収したベイトを選択培地に置床して 38℃ の高温条件で培養すれば半選択的に検出可能である (WATANABE et al., 2008)。また、3 種の高温性 *Pythium* 属菌 (*P. aphanidermatum*, *P. myriotylum*, *P. helicoides*) は LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) プライマーが開発されており (FUKUTA et al., 2013; 2014; TAKAHASHI et al., 2014)、ベイト法と組合せることで、さらに簡易で精度の高い検出が可能である。

3 トラップの作製手順

本稿では、入手しやすく安価で取り扱いが容易なエゴマ種子を使用したトラップ（以下、エゴマトラップ）の作り方を紹介する。詳しくは、「養液栽培における高温性水媒伝染病害の安全性診断マニュアル」(<http://www.green.gifu-u.ac.jp/~kageyamalab/index.html>, 以下マニュアル) を参照されたい。

(1) エゴマ種子の準備

エゴマ種子は、ホームセンターなどのペットフード売り場で小鳥用のエサとして販売されている (図-1)。種子の表面には雑菌が付着していることが多いので、滅菌してから使用することが望ましい。

(2) 袋詰め

不織布性のお茶パック (95 × 70 mm 程度のもの) にエゴマ種子を 50 粒入れる。計数が面倒な場合は、重量換算するか少量計量用にシャープペンシルのキャップなど適当な容器を探すといよい。

(3) 重り付け

エゴマ種子を入れたお茶パックは、そのままでは水中に沈まないため、特大サイズの事務用クリップを付ける。

The Detection Methods for High-temperature-*Pythium* Species in Hydroponic Culture by Bait and Membrane Filter. By Hideki WATANABE

(キーワード：ベイト法，メンブレン法，高温性 *Pythium* 属菌，検出)



図-1 エゴマの種子



図-2 エゴマトラップ

(4) ひも付け

培養液などに設置する場合は、クリップを付けたお茶パックに、ビニルひもをステープラーで留める(図-2)。使用するひもは、幅 6 mm 程度の荷造りひもが適しており、設置する場所によって長さは適宜調節する。また、大きな培養液タンクなどに設置する場合には検出精度を高めるため、ひもの長さを変えてエゴマトラップを複数連結して設置するのもよい。

(5) オートクレーブ

作製したエゴマトラップは、アルミホイルで 1 セットずつ包んでからオートクレーブ滅菌したものを保存しておくと便利である。オートクレーブ装置が利用できない場合には、お茶パックに入れる前のエゴマ種子を電子レンジで 600 W, 5 分間処理することにより簡易に滅菌が可能である。

表-1 培養液タンクへのベイトトラップの設置深度と高温性 *Pythium* 属菌の分離頻度

設置場所 ^{a)}	タンク A	タンク B	タンク C
上	0	48	0
中	16	100	8
下	2	98	6

トマト養液栽培施設の培養液タンク(2t)にエゴマトラップを 3 日間設置した後、種子 50 粒を NARM 培地に置床、38℃で 24 時間培養後に分離頻度(%)を求めた。

^{a)} タンク内の水位は約 95 cm, トラップの設置場所 上: 水面付近, 中: 表面から 30 cm 深, 下: 表面から 60 cm 深。

4 検出手順

(1) トラップの設置方法

1) 原水, 培養液からの検出

原水に用水や地下水を使用している場合には、*Pythium* 属菌が検出されることがあるので、安全性を確認するために調べておいたほうがよい。また、育苗施設や本圃の循環培養液についても、適切な時期に診断を行う。診断適期は品目によって異なるので、詳しくはマニュアルを参照されたい。以下にトラップの設置方法を示す。

原水タンクや培養液タンク内にエゴマトラップを沈める。設置する深さは、タンク内の中～底部が適しており、検出率は上部と比較して安定して高い(表-1)。トラップの最適な設置期間について検討するため、*Pythium aphanidermatum* の遊走子を添加した水(水温 25℃)に設置したエゴマ種子への本菌の感染過程を顕微鏡観察した。その結果、設置 1 日後に一部の種子表面に菌糸が確認され、2 日後に遊走子形成が確認された。このことから、培養液などに設置したエゴマトラップ内では、感染種子から隣接するエゴマ種子へ菌糸や遊走子によって



図-3 トラップ法による土壌からの検出

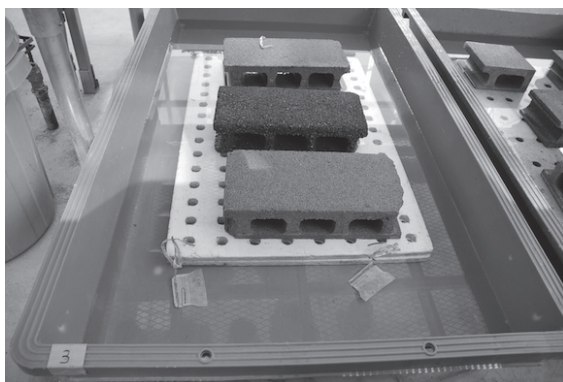


図-4 トラップ法による資材からの検出

3日程度で二次感染し感染率が高くなるため、設置期間は3日程度が適当であると考えられる。設置期間は、長くするほど種子が腐敗するため、最大でも7日以内とする。

2) 土壌からの検出

Pythium 属菌は土壌中に広く存在している。同一作物を毎年生産している圃場内および施設周辺の土壌中には、当該作物に病原性を有する特定の *Pythium* 属菌が高頻度に検出されることがある。また、鉢物生産においては、購入培土であっても購入後の保管状況が悪い場合や、再調整の作業中に病原菌が混入することがある（渡辺, 2011）。土壌や培養土から *Pythium* 属菌を検出する場合には、以下のようにするとよい。

土を複数箇所からサンプリングし、容積 1 l 程度の広口ボトルに半分ほど詰め、2 倍量（体積比）の水道水とエゴマトラップを入れ、軽く混和する（図-3）。水道水には 1 ppm 程度の塩素が含まれるが、本条件下では *Pythium* 属菌の検出感度に影響しない。また、培養土に肥料が混和されている場合には、塩類濃度が高いと検出感度が低下することがあるので、希釈水量を多めにする（EC 0.5 dS/m 以下）。設置温度は 20～25℃ が適当で、培養機器がない場合は日陰の涼しい室内に置く。設置期間は上記と同様に 3 日程度でよい。

3) 資材からの検出

Pythium 病害が発生したシステムで使用していた栽培資材には、病原菌が生残している可能性が高いため洗浄、殺菌を行う必要がある。資材消毒の効果を簡易に評価する場合や、伝染源の調査を目的に資材からの検出を行う際には、以下のようにするとよい。

適当な大きさの清浄な容器に水道水を張り、資材とエゴマトラップを入れる。スチロールパネルなど水に浮きやすい資材はブロックなど（清浄なもの）で浮かないように工夫が必要である（図-4）。夏期は、直射日光が当

たる場所では水温が上昇しやすいので、日陰の涼しい場所に設置する。設置期間は上記と同様に 3 日程度とする。

(2) 検出方法

回収したエゴマ種子から高温性 *Pythium* 属菌を検出する方法は、選択培地を用いた培養法（ベイト-培養法）と種特異プライマーを用いた LAMP 法（ベイト-LAMP 法）の 2 通りがある。

1) ベイト-培養法

トラップを回収したらキムタオルなどでお茶パックの表面から水分をよく取り除く。エゴマ種子を取り出し、NARM 培地（MORITA and TOJO, 2007）にピンセットで種子を置き、38℃で 1～2 日間培養する。高温性 *Pythium* 属菌 3 種の場合は、菌糸伸長が 1 日当たり 20～30 mm と旺盛であるのに対して、他の *Pythium* 属菌や多くの糸状菌の生育は抑制されるので、識別は比較的容易である。ただし、高温性 *Pythium* 属菌 3 種は区別できないので、必要な場合にはさらに形態観察するか LAMP 法により同定する。本法は、*Pythium* 菌量を定量的に評価することには限界があるが、筆者は 9 cm シャーレ 1 枚当たりエゴマ種子を 5 個ずつ置床して、種子 30～50 個当たりの分離頻度を調べている。高温性 *Pythium* 属菌ではないが、同様の手法により調査した事例を表-2 に示す。*Pythium* Group F による病害が発生しているミツバ生産施設のスチロールパネルから、ベイト-培養法により *Pythium* 属菌が検出され、殺菌方法により分離頻度に違いが認められた。

2) ベイト-LAMP 法

回収したトラップからエゴマ種子を取り出し、15 ml のコニカルチューブに入れて、5 ml の滅菌水とともによく振って 5 μ l を LAMP 反応の鋳型とする。別途準備した LAMP 反応液に鋳型を添加し、約 65℃ に調整した湯を入れた保温性ジャーで 1 時間保温し、反応液の色が

表-2 スチロールパネルの洗浄，殺菌処理と *Pythium* 属菌の分離頻度

処理方法	反復	分離頻度 (%)
洗浄・殺菌なし	I	94
	II	90
	III	98
ケミクロン G (× 1,000) 10 分間処理	I	4
	II	24
	III	2
蒸気室 (60℃) 6 時間処理	I	0
	II	0
	III	0
温湯 (60℃) 30 分間処理	I	0
	II	0
	III	0
対照 (水のみ)	I	0
	II	0
	III	0

ミツバ栽培施設のスチロールパネルを供試。主要な発生病害は *Pythium* Group F による根腐病。ベイト法による調査 (3 反復)。水温 25℃, 3 日間処理, エゴマ種子 50 個を NARM 培地に置床, 25℃ で 24 時間培養後の分離頻度。

空色に変わっているものを陽性と判断する。詳しくはマニュアルを参照されたい。

II メンブレン法

1 メンブレン法とは

メンブレンフィルターを用いて植物病原菌を検出する試みは, *Pythium* 属菌, *Phytophthora* 属菌, *Fusarium* 属菌, *Plasmodiophora* 属菌および各種細菌等で行われている (HONG et al., 2002; 小原ら, 2004; 渡辺・景山, 2007; 鈴木・伏見, 2011)。近年は, PCR 法や LAMP 法をはじめとした遺伝子検出技術の開発が進んできており, メンブレン法にこれらの手法を組合せることで, さらに汎用性が高い検出技術とすることが可能である。HONG et al. (2002) は, 市販の 9 種類のメンブレンフィルターを用いて, 水サンプルから *Pythium* 属菌および *Phytophthora* 属菌の検出精度を比較し, 検出に適したフィルターの種類・孔径を明らかにしている。

2 メンブレン法の特徴

本法は, 培養液など水サンプルからの迅速な検出に適している。ベイト法は, 3 日程度の設置期間が必要であるのに対して, メンブレン法は採取当日に処理可能である。また, ベイト法の適用範囲は *Pythium* 属菌や *Phytophthora* 属菌等に限定されるが, メンブレン法は前述のように多様な病原菌を対象とすることができるため, 汎



図-5 メンブレン法による培養液からの検出

用性が高い。さらに, ベイト法は培養液中の菌量を把握するには限界があるが, メンブレン法は後述のように定量的に評価することができる。このように, メンブレン法はベイト法と比較して優れている点も多いが, 検出感度はベイト法のほうが高い傾向にあり, 1 個/l 以下のような菌密度が低い場合には適さない。

メンブレンフィルター上に捕捉した高温性 *Pythium* 属菌は, 選択培地や遺伝子診断技術により検出する。

3 検出手順

(1) 水の採取とろ過

現地の培養液タンクなどから必要量を採取する。採取量を多くするほど低密度から検出可能であり目的に応じた量を採取する。ホウレンソウ立枯病の場合, 病原菌密度が 50 個/l 以上で発病リスクが高くなるので, 発病前に早期診断するためには, それ以下の菌密度で検出する必要がある。仮に 1/10 の菌密度で検出するためには, 200 ml のサンプル中に 1 個検出されるか否かが基準となる。採取する量が決まったら, ろ過装置にメンブレンフィルター (Millipore 社, Durapore® 孔径 5 μm, 47 mm 径, 品番 SVWG04700) をセットして, 小型真空ポンプまたはシリンジポンプでサンプルを吸引ろ過する (図-5)。なお, サンプルの汚濁度が高い場合, メンブレンフィルターが目詰まりして処理が困難な場合がある。その場合は, ハイフロスーパースル (珪藻土) を使用すると大幅に改善できる (渡辺ら, 2013)。詳しい手順はマニュアルを参照されたい。

(2) 検出方法

回収したメンブレンフィルターは, NARM 培地の表面にろ過面を下にして置床する。高温性 *Pythium* 属菌を対象とする場合には, 38℃ で 1 ~ 2 日培養すればメンブレンフィルターの周縁部に旺盛な菌糸生育が認められる。種の同定が必要な場合は, 菌を単離して形態観察を行うか, 培地から菌糸片を採取し LAMP 法で確認する。

また、本法は水サンプル中の高温性 *Pythium* 属菌の菌密度を定量的に評価することが可能である。以下に、例を示す（検出限界値 1 個/l）。

- 1) 1 l のボトルにサンプルを満杯に採取する。
- 2) 処理直前に十分攪拌し、マイクロピペットで 1 ml, 10 ml をそれぞれ NARM 培地に流して培地表面に広げる。
- 3) 100 ml および 1,000 ml をメンブレンフィルター（孔径 5 μ m）で吸引ろ過し、メンブレンフィルターの表面を下にして NARM 培地に置床する。
- 4) 38℃ で培養 1 日後に、1 ml および 10 ml 処理区は余剰液を捨て、100 ml および 1,000 ml 処理区はメンブレンフィルターを取り除く。
- 5) 高温性ピシウム菌のコロニー数を数え、単位水量当たりの菌密度を算出する。

お わ り に

現地の養液栽培施設や鉢物生産施設で病害が発生した場合、正確な同定診断や伝染経路の解明、対応策等必要なアドバイスは、普及指導機関や公設試験場および企業へ依頼されるケースが多い。また、病害発生前から施設全体のリスクを把握し、改善することは安定生産を行う

うえで最も重要であり、ここで紹介した検出技術が、それらの一助となれば幸いである。バイト法およびメンブレン法は、従来から利用されている手法であるが、LAMP 法など最新の遺伝子診断技術と組合せることで検出精度を向上させることができるようになってきた。今後は、さらに多くの植物病原菌に対する遺伝子検出プライマーを開発し、汎用性を高めていくことが望まれる。

引 用 文 献

- 1) FUKUTA, S. et al. (2013): Eur. J. Plant Pathol. **136**: 689 ~ 701.
- 2) ——— et al. (2014): Let. Appl. Microbiol. (in press)
- 3) HENDRIX, F. F. and W. A. CAMPBELL (1970): Can. J. Bot. **48**: 377 ~ 384.
- 4) HONG, C. et al. (2002): Phytopathology **92**: 610 ~ 616.
- 5) 小原達二ら (2004): 日植病報 **70**: 115 ~ 122.
- 6) MORITA, Y. and M. TOJO (2007): Plant Dis. **95**: 1591 ~ 1599.
- 7) SANCHEZ, J. et al. (2000): Eur. J. Plant Pathol. **106**: 209 ~ 214.
- 8) 鈴木幹彦・伏見典晃 (2011): 関東東山病虫研報 **58**: 113 (講要).
- 9) TAKAHASHI, R. et al. (2014): FEMS Microbiol. Let. (in press)
- 10) THINGGAARD, K. and H. ANDERSEN (1995): Plant Dis. **79**: 259 ~ 263.
- 11) 渡辺秀樹・景山幸二 (2007): 日植病報 **73**: 212.
- 12) ——— (2011): 植物防疫 **65**: 77 ~ 81.
- 13) ———ら (2013): 関西病虫研報 **55**: 65 ~ 66.
- 14) WATANABE, H. et al. (2008): J. Gen. Plant Pathol. **74**: 417 ~ 424.
- 15) WATANABE, T. (1981): Ann. Phytopath. Soc. Japan **47**: 449 ~ 456.
- 16) ——— (1984): Plant Dis. **68**: 697 ~ 698.

農林水産省プレスリリース (26.4.16 ~ 5.15)

農林水産省プレスリリースから、病害虫関連の情報を紹介します。

<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan> の後にそれぞれ該当のアドレスを追加してご覧下さい。

◆「平成 26 年度病害虫発生予報第 1 号」の発表について
(4/17) /syokubo/140417.html

◆「平成 26 年度病害虫発生予報第 2 号」の発表について
(5/15) /syokubo/140515.html